

Н.А. Алексеев

## ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДРОТАВЕРИНА ГИДРОХЛОРИДА В КРОВИ ПРИ БИОЭКВИВАЛЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Витебский государственный медицинский университет

Дротаверина гидрохлорид (но-шпа; 1-(3',4'-диэтоксibenзилиден)-6,7-диэтокси-1,2,3,4-тетрагидро-изохинолина гидрохлорид) относится к миотропным спазмолитическим средствам группы производных изохинолина и используется при спазмах желудка и кишечника, спастических запорах, а также при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и др. [4]. Данный препарат характеризуется высокой эффективностью и хорошей переносимостью, поэтому пользуется большой популярностью у населения. Высокий спрос на данный препарат делает необходимым его производство в странах СНГ, для чего требуется проведение биоэквивалентных исследований. В литературе описаны методики определения дротаверина в крови методом ВЭЖХ [6, 9], однако они требуют применения дорогостоящего оборудования, высокоэффективных хроматографических колонок и высокочистых реактивов. При проведении большого числа рутинных анализов при исследовании биоэквивалентности препаратов (около 500 проб для одного препарата) описанные методики экономически невыгодны, что существенно ограничивает их применимость для названных целей.

Целью настоящей работы является разработка экономичной и экспрессной методики определения дротаверина в крови при биоэквивалентных исследованиях.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и стандартные образцы.** Использовали стандартный аналитический образец дротаверина гидрохлорида ("Chinoïn", Венгрия) с содержанием действующего вещества 99,8%. Стандартные растворы готовили растворением навески вещества в бидистиллированной воде, рабочие растворы готовили разведением стандартного раствора до получения градуировочных

растворов с концентрацией дротаверина 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00; 5,00 мкг/мл. В качестве внутреннего стандарта использовали папаверин, соответствующий требованиям нормативной документации. Концентрация внутреннего стандарта составляла 1,0 мкг/мл.

Ацетонитрил ("Криохром", Россия) квалификации "осч" перед работой очищали перегонкой. Использовали бидистиллированную воду, дигидрофосфат калия квалификации "х.ч.", додецилсульфат натрия квалификации "хроматографически чистый". Гексан ("ч.д.а.", "Реанал", Венгрия) и пропанол-2 ("х.ч.") для экстракции предварительно перегоняли.

**Аппаратура и условия хроматографического анализа.** Эксперименты проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе "Миличром-4" (НПО "Научприбор", Россия) со спектрофотометрическим детектором (аналитическая длина волны при определении дротаверина 350 нм). Колонка стальная (120 x 2 мм), заполненная сорбентом Диасорб-130-С<sub>16</sub> зернение 9 мкм ("Элсико", НПО "Диагностикум", Россия). Подвижная фаза (ПФ) - 1Ч10<sup>-2</sup> моль/л дигидрофосфат калия - ацетонитрил (35:65) с добавлением 1Ч10<sup>-3</sup> моль/л додецилсульфата натрия. рН ПФ 3,1-3,5 устанавливали при помощи фосфорной кислоты. Расход ПФ - 200 мкл/мин, масштаб регистрации 0,2 AUFS, сканирование 0,6 сек<sup>-1</sup>. Удерживаемый объем несорбируемого компонента (нитрит натрия) составил 230 мкл. Удерживаемый объем папаверина (внутренний стандарт) - 365-370 мкл, дротаверина - 635-640 мкл. Общее время анализа составляет 6 мин. Эффективность колонки по дротаверину составила 4500-4700 теоретических тарелок.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Извлечение дротаверина из сыворотки крови.** В настоящее время наиболее применяемым вариантом пробоподготовки при определении малых количеств (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-6</sup> г) веществ в биологических жидкостях является экстракция органическими растворителями [7,10], реже используется прямой ввод образца в хроматографическую систему [10]. Последний требует применения дорогостоящего высокочувствительного оборудова-

ния и предколонок. Сорбционное выделение дротаверина, являющегося слабым основанием, на ионизируемых сорбентах (кремнеземы, карбоксильные иониты) невозможно из-за высокой конкуренции биогенных веществ (аминокислот, пептидов) за места связывания с сорбентом [2], а химически модифицированные кремнеземы (ХМК) с привитыми гексадецильными группами (Диасорб  $C_{16}$ ), как показали исследования методом ВЭЖХ, прочно удерживают достаточно гидрофобную молекулу дротаверина, что существенно снижает степень десорбции его с сорбента.

Экстракция органических веществ из биологических жидкостей, как показано в многочисленных исследованиях [7,10], характеризуется высокими степенями загрязнения хроматографируемого образца и сравнительно невысокими степенями извлечения. Снизить степень загрязнения анализируемой пробы эндогенными (чаще всего полярными веществами) можно, используя в качестве экстрагентов алканы или другие малополярные растворители. Нами установлено, что дротаверин удовлетворительно экстрагируется *n*-гексаном (степень однократной экстракции из водной фазы при pH 9,2 составляет 97,8%). Поэтому в качестве экстрагента выбран данный растворитель. Эксперименты, проведенные с кровью, к которой предварительно прибавляли известное количество дротаверина и внутреннего стандарта, показали, что гексан извлекает всего 25-28% введенного количества дротаверина, что, возможно, объясняется высокими степенями связывания данного вещества с белками плазмы крови. Установлено, что прибавление к экстракционной системе пропанола-2 (5-10% от объема экстрагента) значительно увеличивает экстракцию дротаверина (до 77-86%).

**Методика.** Кровь добровольца, отобранную из вены, предварительно центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 мин, затем к 2 мл супернатанта (или градуировочного раствора, представляющего собой образец донорской крови, свободной от дротаверина, с добавлением известного количества дротаверина) прибавляли 0,2 мл водного раствора внутреннего стандарта - папаверина гидрохлорида (концентрация 5 мкг/мл), 0,2 мл 25% раствора аммиака, 0,2 мл насыщенного раствора хлорида натрия (для улучшения расслоения системы), 0,2 мл пропанола-2 и 2

мл гексана. Флаконы плотно укупоривали полиэтиленовой пробкой и встряхивали 15 мин в аппарате для встряхивания, центрифугировали (4000 об/мин - 15 мин), верхний гексановый слой отбирали в сухой чистый флакон из стеклотрота вместимостью 5 мл и упаривали досуха при 60-70°C на водяной бане в токе сухого азота. Сухой остаток растворяли в 0,1 мл подвижной фазы для ВЭЖХ и 10 мкл полученного раствора вводили в хроматографическую систему.

**Хроматографические характеристики дротаверина и папаверина на гексадецил-ХМК.** Поскольку дротаверин и папаверин (внутренний стандарт) различаются между собой длиной углеродной цепи, то использование неполярных сорбентов для ВЭЖХ позволяет эффективно разделять эти вещества. Основность изучаемых соединений несколько различается, поэтому исследовали зависимость удерживания их на колонке Диасорб  $C_{16}$  от pH подвижной фазы (рис. 1). С увеличением значения pH элюента, как видно из рис. 1, коэффициент селективности возрастает, что приводит к увеличению времени анализа (более 15 мин) и некоторому уменьшению эффективности. Поэтому при дальнейших исследованиях использовали ПФ с pH 3,1-3,5.

Для описания влияния органического модификатора ПФ (ацетонитрила) на удерживание разделяемых соединений изучали зависимость

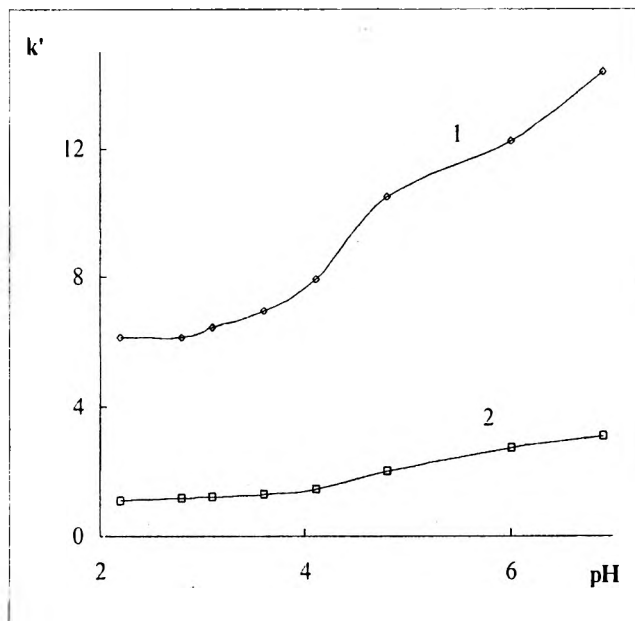


Рис. 1. Зависимость коэффициента емкости ( $k'$ ) дротаверина (1) и папаверина (2) от pH подвижной фазы (ПФ: ацетонитрил -  $1 \text{ CH}_2\text{O}^{-2}$  моль/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40:60).

коэффициента емкости от молярной доли ацетонитрила (N) в ПФ [5]. На рис. 2 приведены зависимости  $1/k'$  от N (модель Скотта-Кучеры) и  $\lg k'$  от  $\lg N$  (модель Снайдера-Сочевиньского). Данные модели удовлетворительно описывают хроматографические параметры дротаверина и папаверина в диапазоне содержания ацетонитрила 30 - 70% (по объему). При выходе из этого диапазона может наблюдаться отклонение от линейности, связанное с ассоциацией органического модификатора и молекул сорбата [3], а также падает эффективность разделения (примерно в 3-4 раза), поэтому ПФ с другим содержанием ацетонитрила не исследовали. Угловой коэффициент зависимости  $\lg k'$  от  $\lg N$  (рис. 2Б) показывает, что боковые заместители в положении 6,7 и 3',4' в молекулах папаверина и дротаверина играют

определяющую роль в удерживании этих веществ на ХМК с привитыми гексадецильными группами. Так, при сорбции 1 моль дротаверина на поверхности Диасорба  $C_{16}$  с сорбента вытесняется 2 моль ацетонитрила, в то время как папаверин при сорбции вытесняет 1 моль органического модификатора.

По эмпирическому уравнению (1), предложенному в [11]:

$$\lg k' = \lg k'_w - SF \quad (1),$$

где  $k'_w$  - значение коэффициента емкости хроматографируемого вещества при использовании воды в качестве ПФ,  $F$  - объемная доля спирта,  $S$  - эмпирическая константа, были рассчитаны коэффициенты емкости папаверина и дротаверина при использовании воды в качестве подвижной фазы. Полученные значения  $k'_w$  для разделяемых веществ значительно отличаются, что существенно затрудняет использование данного сорбента для совместного выделения дротаверина и папаверина из водных растворов; высокие значения  $k'_w$  дротаверина, кроме этого, не позволяют добиться количественной десорбции этого вещества с сорбционной колонки при помощи минимального количества подвижной фазы (при проведении сорбционного концентрирования).

В изучаемых ПФ наблюдается некоторая асимметричность пиков дротаверина, поэтому в ПФ прибавляли ион-парный реагент - додецилсульфат натрия [1, 8]. Прибавление данного реагента ( $10^{-3}$  моль/л) практически не влияет на коэффициент емкости  $k'$ , но существенно улучшает форму хроматографического пика.

#### Количественное определение дротаверина.

Для приготовления градуировочных смесей использовали донорскую кровь, свободную от дротаверина. К 10 мл крови прибавляли известное количество стандартного раствора дротаверина до получения концентрации 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00 мкг/мл, оставляли до установления равновесия на 2 часа, после этого центрифугировали (6000 об/мин - 10 мин) и проводили пробоподготовку как описано выше. Сухой остаток после упаривания экстрагента растворяли в 0,1 мл ПФ и аликвоту анализировали. Градуировочный график для определения дротаверина в крови линейен в диапазоне концентраций от 0,10 до 5,00 мкг/мл ( $S=0,854K \pm 0,02$ , коэффициент корреляции

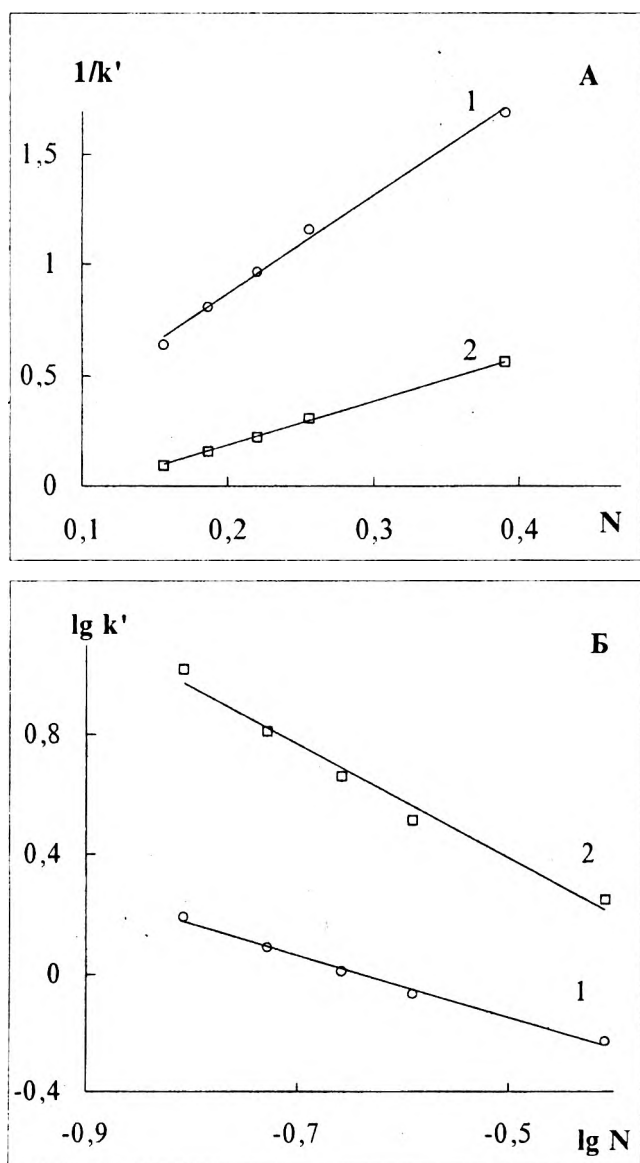


Рис. 2. Модели удерживания папаверина (1) и дротаверина (2) на Диасорбе  $C_{16}$

0,9998, К - отношение площадей пиков дротаверина и папаверина). Предел обнаружения дротаверина

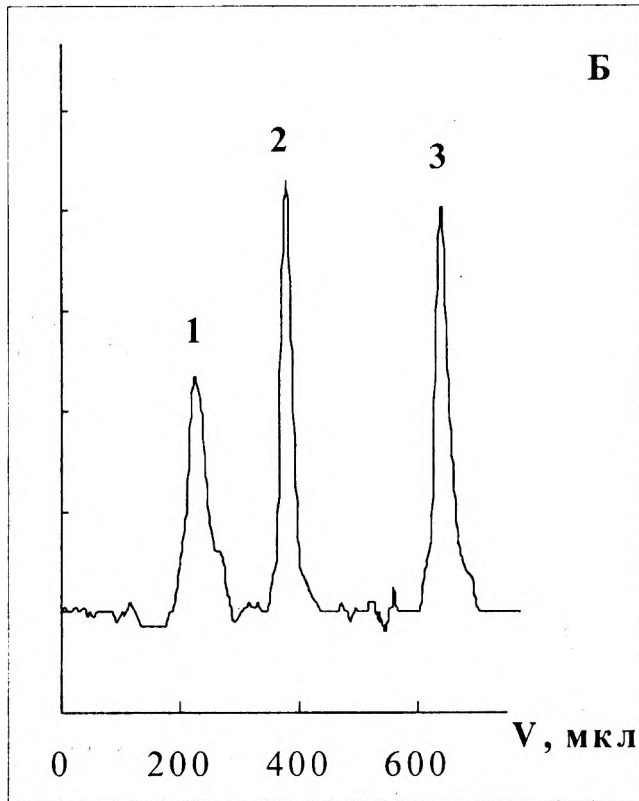
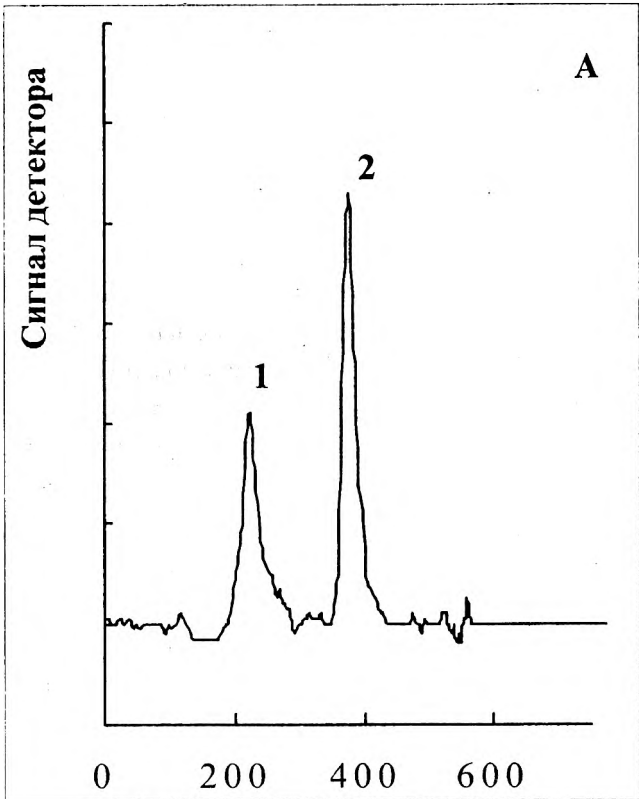


Рис. 3. Хроматограмма определения дротаверина в крови. А - сыворотка крови без добавления дротаверина; Б - сыворотка крови с добавлением 0,50 мкг/мл дротаверина.  
1 - эндогенные вещества, 2 - папаверин (внутренний стандарт), 3 - дротаверин.

верина в крови 0,07 мкг/мл (отношение сигнал/шум=5). Результаты определения (метод “введено-найдено”) дротаверина в сыворотке крови приведены в табл. 2. Хроматограмма определения дротаверина в крови приведена на рис.3.

Таким образом, определены хроматографические характеристики дротаверина и папаверина на ХМК с привитыми гексадецильными группами. Разработана экспрессная и недорогая методика определения дротаверина при биоэквивалентных исследованиях, включающая экстракцию исследуемого вещества смесью *n*-гексан-пропанол-2 (10:1) из щелочной среды с последующим определением методом ВЭЖХ (внутренним стандартом - папаверином).

Таблица 1  
Коэффициенты уравнения (1) для дротаветина и папаверина на колонке Диасорб С<sub>16</sub> (органический модификатор - ацетонитрил)

Соединение	-S	lg k' <sub>w</sub>	r	k' <sub>w</sub>
Папаверин	0,01	0,65	0,990	4,4
Дротаверин	0,03	2,06	0,997	116,1

Таблица 2  
Результаты определения дротаверина в крови (n=7, P=0,95)

Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	S <sub>r</sub>
0,10	0,09 ± 0,02	0,24
0,20	0,17 ± 0,04	0,23
0,50	0,46 ± 0,04	0,08
1,00	0,84 ± 0,05	0,07
2,00	1,84 ± 0,10	0,06
5,00	3,84 ± 0,09	0,03

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев Н.А. // Автореф. дисс... канд. фарм. наук. Витебск, 2000, 20 с.  
2. Казакова О.А., Гунько В.М., Воронин Е.Ф. и др. // Коллоид. журн. 1998. Т.60, N 5. С. 613.  
3. Ланин С.Н., Ланина Н.А., Никитин Ю.С. //

Журн. физич. химии. 1995. Т. 69, N 11. С. 2045 - 2051.

4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Вильнюс, 1993. С. 393.
5. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. - Рига: Зинатне, 1988. 390 с.
6. Bolaji O.O., Onyeji C.O., Ogungbamila F.O. et al. // J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1993. V. 133. P. 93-97.
7. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids, and post-mortem material. -2nd. ed. London: The Pharmaceutical Press. - 1986. - 1223 p.
8. Girgis E.H. // J. Pharm. Sci. 1993 V. 82, N 5. P. 503-505.
9. Lalla J.K., Shah M.U., Jain M.B., Sharma A.H. / J. Pharm. Biomed. Anal. 1993. V. 11, N 4-5. P. 385-388
10. McDowall R.D. // J. Chromatogr. 1989. V. 492. P. 3 - 58.
11. Melander W.R., Horvath C. High-performance liquid chromatography. Advances and perspectives. V.2 New-York: Academic Press, 1980. P. 113.

## РЕФЕРАТ

Н.А. Алексеев

### ВЭЖХ-ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДРОТАВЕРИНА ГИДРОХЛОРИДА В КРОВИ ПРИ БИОЭКВИВАЛЕНТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Изучены хроматографические параметры удерживания дротаверина и папаверина на гексадецилсиликагеле при использовании смесей водный раствор дигидрофосфата калия - ацетонитрил в качестве подвижных фаз. Разработана методика определения дротаверина в крови методом ВЭЖХ (внутренний стандарт - папаверин), которая характеризуется высокой чувствительностью (предел обнаружения 0,07 мкг/мл) и хорошей воспроизводимостью ( $S_r = 0,03-0,24$  при концентрациях дротаверина в крови 0,1-5,0 мкг/мл).

## SUMMARY

N.A. Alexeev

### HPLC-DETERMINATION OF DROTAVERINE HYDROCHLORIDE IN HUMAN BLOOD AT BIOEQUIVALENT STUDIES

Chromatographic parameters of drotaverine and papaverine on hexadecyl-bonded silica in water  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution - acetonitrile mixtures as mobile phases are studied. The highly sensitive and well reproduced procedure of the determination of drotaverine (internal standard - papaverine) in human blood by HPLC is worked out.

А.А.Шеряков, Ю.А.Шерякова, Л.А.Пусь

## РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИНКОМИЦИНА ГИДРОХЛОРИДА В РАСТВОРЕ ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ

Республиканская контрольно-аналитическая лаборатория УП "Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении",  
Борисовский завод медицинских препаратов

*Предложен рефрактометрический метод количественного определения линкомицина гидрохлорида в растворе для инъекций. Метод прост и экспрессен по сравнению с биологическим.*

Линкомицина гидрохлорид - антибиотик, продуцируемый *Streptomyces lincolnensis* или другими родственными актиномицетами. Применяют линкомицина гидрохлорид гидрохлорид внутримышечно, внутривенно или внутрь, а также местно при лечении септических состояний, вызванных стафилококками и стрептококками [ 5 ].

Количественное определение линкомицина гидрохлорида в 30% растворе для инъекций согласно нормативной документации [ 1 ] проводят методом диффузии в агар. Недостатком данного метода является его длительность во времени (около 7 дней), что не позволяет оперативно проводить контроль качества приготовленного раствора в процессе производства, а также готовой продукции. В связи с этим выпуск одной серии раствора линкомицина гидрохлорида 30% для инъекций длится в течение 15 дней.

Линкомицина гидрохлорид является оптически активным веществом (удельное вращение 4% раствора от  $+135^\circ$  до  $+150^\circ$  в пересчете на сухое вещество) [ 2-4 ], нами поставлена цель применить рефрактометрический метод для количественной оценки линкомицина гидрохлорида в растворе для инъекций, что подтвердили предварительные исследования.

В качестве объектов исследования использовали: фармацевтическую субстанцию линкоми-